

Minulost a současnost NMR spektrometrie – jak pohlédnout do nitra molekul i člověka

Jiří Brus, Jaroslav Kříž

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6 – Petřiny
 brus@imc.cas.cz

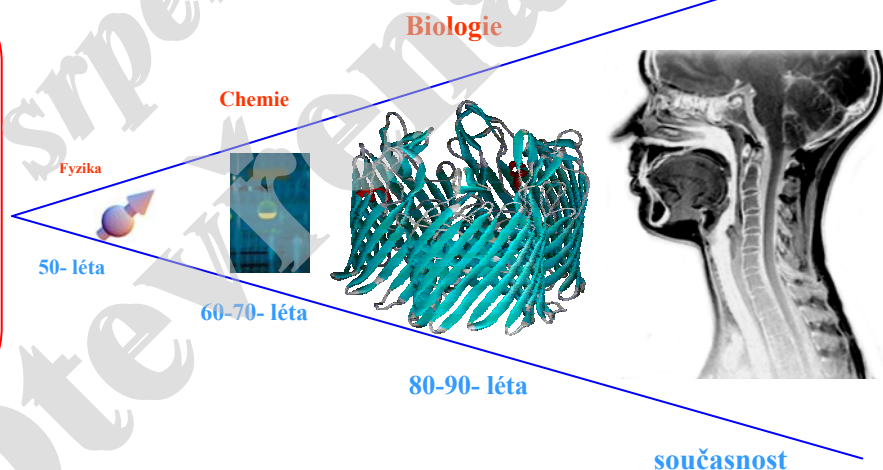
Úvod

Krátce po svém objevení byla spektroskopická metoda – Nukleární *M*agnetická *R*ezonance výhradně doménou fyziků a její využití bylo poměrně omezené. S objevem a pochopením vztahu mezi chemickou strukturou a polohou resp. tvarem NMR signálů se však její vliv rychle přenesl do chemie, kde se významně uplatnila a stále uplatňuje jako nepřekonatelná metoda strukturní analýzy při určování struktur malých organických a organokovových sloučenin, přírodních látek a syntetických polymerů.

NMR spektrometrie



Lékařství



S rozvojem experimentálních postupů a přístrojového vybavení pak přednosti této metody elegantně využila strukturní biologie při popisu komplikovaných proteinových struktur, nukleových kyselin a jiných komplexů. Dnes již lze nalézt významné aplikace v průmyslu, především ve farmacii, ale i při identifikaci takových produktů jako jsou potraviny nebo produkty metabolismu. Dnešní „proteomický“ a „metabonomický“ výzkum se bez moderní

NMR spektrometrie jen těžko obejde. V současné době však NMR spektrometrie zasahuje do našeho života snad nejvíce v lékařství a to jako zcela neinvazní diagnostická metoda.

Energie uložená v atomovém jádře

Ačkoli slovo „nukleární“ v nás může vyvolávat řadu smíšených pocitů spojovaných s řízeným i neřízeným uvolňováním obrovské energie při rozpadu atomového jádra téměř podle známého vztahu $E = m.c^2$, nukleární magnetická rezonance (NMR) překvapivě pracuje s energiemi, které jsou velmi nepatrné. Mnohdy je vůbec nedokážeme odlišit od elektronického šumu způsobeného tepelným pohybem atomů vodiče v elektronických součástech spektrometru. Proto musíme měření mnohokrát opakovat a signály postupně načítat. Přesto, anebo možná právě proto, je NMR spektrometrie tak rychle se vyvíjející oblast strukturní analýzy. Nedávný rozvoj experimentálních postupů a elektronických součástí vedl k tomu, že dosažené rozlišení a selektivita NMR experimentů umožňují velmi přesně popisovat strukturu a vnitřní pohyblivost širokého spektra látek (od velice tvrdých a rigidních skel, organických i anorganických krystalů, přes syntetické polymery až po velice měkké a pohyblivé gely a roztoky polypeptidů či proteinů). Díky tomu je možné popsat třírozměrné uspořádání i u takových látek, které jen velmi neochotně poskytují krystaly vhodné k rentgenové difrakci, které jsou nerozpustné anebo poskytují pouze velmi zředěné roztoky. To umožnila především úžasná technologie kryosond. V nich jsou detekční cívka a předzesilovače signálu tak silně ochlazeny, že je potlačen tepelný pohyb atomů ve vodičích a s ním i elektronický šum. Tím se potřebný experimentální čas sníží až 16-krát. Navíc je řada fyzikálních veličin sledovaných metodou NMR citlivých na rychlost a amplitudu vnitřních pohybů látek, a tak právě NMR spektrometrie podává komplexní informace o vnitřní struktuře a uspořádání hmoty. Proto můžeme NMR spektroskopii směle považovat za metodu komplementární k rentgenové difrakci. Ačkoli NMR spektrometrie poskytuje významné krystalografické informace, cílem NMR spektroskopiků není zcela nahradit difrakční techniky, ale především doplnit chybějící údaje k úplnému popisu struktury a dynamiky krystalických a vysoce organizovaných systémů. Zatímco difrakční techniky jsou téměř slepé k atomům vodíku, protože ten se vyznačuje jen malou elektronovou hustotou, NMR experimenty jsou k přítomnosti vodíku ^1H velmi citlivé. Nejen díky tomu se NMR spektrometrie tuhého stavu stala významnou součástí charakterizace farmaceuticky aktivních substancí a od roku 1997 je doporučována i hlavním a přísným regulátorem trhu s léčivými v USA a tedy i na světě - FDA (Food and Drug Administration).

Spin částice a jeho původ

Začněme od začátku. Před více než 13 miliardami let se zrodil vesmír. Během kratičkého období hadronů (10^{-6} – 1 s) se z kvarků vytvořily protony a neutrony. V těchto raných dobách však vesmír byl ještě příliš horké místo na to, aby elektrony a protony „držely“ v atomech dohromady. Proto osamocně bloudily malým, horkým a velice hustým vesmírem.



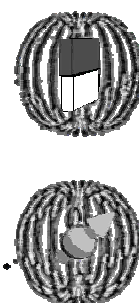
Obrázek 1. Obraz „Spin“ od Mary Burke

Ale již v té době měl proton, což je pořád nejjednodušší atomové jádro, svou klidovou hmotnost, náboj a **spin**. Když pak během období nadvlády zářivých polí a v období nukleosyntézy (3 min – 379 000 let) vesmír zchladl na teplotu asi 3000 K, protony a neutrony se již mohly spojovat do atomových jader a spolu s elektrony tvořit nejjednodušší atomy a molekuly a posléze i těžší jádra. To byly a jsou především molekuly vodíku H_2 . I v těchto atomech a molekulách si jednotlivé elementární částice ponechaly výše uvedené vlastnosti tedy i **spin**. Proto **spin** není vlastností pouze protonů a elementárních částic, ale i velké většiny dalších částic včetně těžších atomových jader.

Kde hledat počátky NMR spektrometrie?

Spin, tato vlastnost mnoha částic, nemá zcela úplnou makroskopickou analogii. Může trochu připomínat rotaci. Ano, rotace je velmi častým jevem a pohybem kolem nás. Je to právě rotační pohyb, který nás pohodlně přesouvá z místa na místo, a který nás stále inspiruje (Obrázek 1.). Všechny makroskopické objekty mohou rotovat kolem vlastní osy a vnějším zásahem plynule měnit svůj moment hybnosti. Mohlo by se tedy zdát, že i elementární částice mohou kol své osy rotovat. Ale i když tomu tak není a my zcela určitě víme, že žádné atomové jádro (tedy ani samotný proton) kolem vlastní osy nerotuje, jeho nerozlučnou vlastností je "vnitřní" moment hybnosti tedy spin. Tento vnitřní jaderný spin poprvé předpověděl Wolfgang Pauli (*1900-†1958, Nobelova cena 1945) v roce 1924 a to prostřednictvím čtvrtého kvantového čísla. O rok později to byli George Uhlenbeck (*1900-†1988) a Samuel Goudsmit (*1902-†1978) kteří interpretovali toto kvantové číslo jako spin. Spin je však vlastnost relativistická a její popis je dokonale propracován v rámci kvantové teorie. Proto se moment hybnosti stejně jako většina dalších vlastností ve světě částic nemění plynule, ale je kvantován.

Zmíníme-li ale termín „relativistická“ musí se nám vybavít jméno jiného velikého badatele, na jehož počest je rok 2005 právem nazýván „Světovým rokem fyziky“. Ano, je to Albert Einstein (*1879-†1955, Nobelova cena 1921), který před sto lety, tehdy jako ještě neznámý patentový úředník v Curychu, uveřejnil sérii článků, které zásadním způsobem změnilы pohled fyziků na podstatu pozorovatelného světa. V obecném povědomí A. Einstein rovná se relativita; a relativistické efekty, jak každý ví, se projevují typicky při rychlostech, blízkých rychlosti světla, v kosmických rozměrech a v gravitačním poli velkých hmot. Ale struktura a dynamika atomů a molekul je prakticky výhradně založena na elektromagnetické interakci, popsané i pro mnohačasticové systémy kvantovou mechanikou, kterou Einstein nejenže nevytvořil, ale dokonce zavrhnul. Jenomže bez Einsteina, bez jeho jasnozřivé interpretace Planckova objevu kvantování světla, by sotva byla nějaká kvantová mechanika vůbec vznikla. Pomocí těchto úvah bychom tedy mohli posunout dobu položení základů NMR spektrometrie do doby před sto lety. Úvaha je to jistě hezká, ale ne zcela korektní, protože tak bychom se mohli dostat i dále až na konec 18. století do doby Francouzské revoluce. O tom se ale zmíním později.



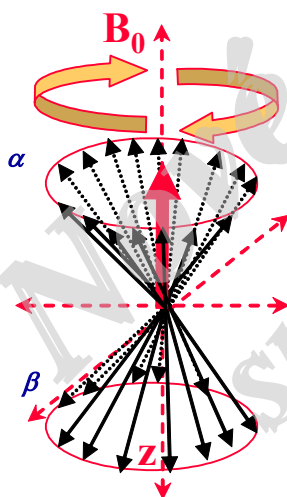
Obrázek 2. Schématická ilustrace magnetických vlastností spinů.

Proč je vodík tak výjimečný?

Možná to vyplývá z výše uvedeného snad až „aristokratického“ původu protonů (tedy i atomů vodíku), ale právě toto atomové jádro má pro NMR spektroskopii výjimečný význam. Je to právě vodík, vyjma zcela neznámé temné látky (dark matter), který i v dnešních dnech tvoří drtivou většinu veškeré známé hmoty vesmíru a v podobě molekul vody a jiných organických molekul i živých organismů. Nejenom že je vodík tak rozšířený, ale jsou to totiž jeho atomová jádra, která díky svému vysokému gyromagnetickému poměru ($2,68 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{rads}^{-1}$) a téměř 100% přirozenému izotopovému zastoupení (^1H) jsou vůbec nejcitlivější ve vztahu k NMR experimentům. Odezva vodíkových jaderných spinů na vnější podněty (excitaci) je největší a přítomnost jaderného spinu atomu ^1H lze vystopovat i na relativně velké vzdálenosti. Atomová jádra vodíku totiž produkují nejsilnější jaderný magnetický moment a projevují se i nejsilnější dipolární interakcí.

Kvantování orientací a energií

Jaderný magnetický moment je přímým důsledkem existence jaderného spinu. Atomové jádro můžeme velmi zjednodušeně považovat za malinkatý magnetický dipól (Obrázek 2).



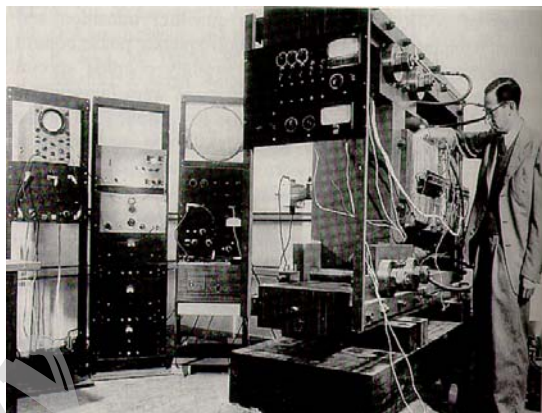
Obrázek 3. Schématická ilustrace kvantování orientace vektoru jaderného magnetického momentu vzhledem k vnějšímu magnetickému poli.

Je-li vhodné atomové jádro (proton) umístěno do silného magnetického pole, přestávají být pro jeho magnetický moment (a současně spin) různé orientace rovnocenné. Za prvé platí kvantování orientace (ne každý směr je povolený) a pak (stejně jako v makroskopickém světě) závisí energie na orientaci magnetického momentu. (Obrázek 3.) Kvantování orientace současně znamená kvantování energie. Tak vznikají energetické stavy, které lze pozorovat pouze v magnetickém poli. Obecně platí, že spin částice může být orientován pouze tak, aby jeho průmět (složka) do požadovaného směru (zde směr magnetické indukce) byla polovinovým násobkem Planckovy konstanty dělené π . To také znamená, že magnetický moment se nikdy nemůže energeticky uplatnit celou svou velikostí. A navíc díky principu neurčitosti, nemůžeme zbývající dvě složky vektoru spinu současně měřit přesně.

Excitace a koherence

Pokud při popisu NMR experimentu zapomeneme na to, že spin není rotace, můžeme se na daný problém podívat i z jiné strany. Na počátku NMR experimentu je „nic“, totální chaos a spiny si dělají co chtějí. Neexistuje žádná makroskopická a tedy i měřitelná magnetizace. Umístíme-li ale látku do magnetického pole, spiny se zorientují do dvou možných směrů a začnou vykonávat precesní pohyb (Obrázek 3). Jejich pohyb ale není zřazovaný, každý spin se nachází v jiné fázi precesního pohybu. Ale protože spinů se souhlasnou orientací se směrem vnějšího magnetického pole je o trošinku více než spinů s opačnou orientací, vektorový součet dává makroskopickou magnetizaci, které říkáme podélná. O ní pouze víme, že existuje, ale nemůžeme ji přímo měřit. Pak systém ozáříme krátkým radiofrekvenčním

pulsem, jehož frekvence (10-950 MHz, frekvence radiových vln) odpovídá frekvenci spinové precese. Díky tomu dojde ke zřázování precesního pohybu a všechny spiny začnou rotovat ze stejné výchozí orientace. Precesní pohyb je tedy fázově koherentní. Říkáme že dosáhneme koherence. Zároveň se populace na obou energetických hladinách vyrovnají a vektorový součet dá příčná magnetizaci. Ta v detekční cívce indukuje napětí, které snímáme ve formě volně dozívající indukce (FID). No a právě tato volně dozívající indukce je nositelkou všech strukturních informací.



Obrázek 4. Felix Bloch ve své laboratoři v roce 1949, kdy byl naměřen první NMR signál.

První NMR signály

Možnosti manipulace s jaderným spinem si jako jeden z prvních povšiml Isidor Isaac Rabi (*1898-†1988, Nobelova cena 1944), který se mimo jiné (např. konstrukce atomových hodin) věnoval rozvoji radarové technologie. Díky tomu se NMR spektrometrie začala více rozvíjet během druhé světové války. K dosažení úspěchu také významně přispěl rozvoj makromolekulární chemie a to především díky objevu polymerů jako je teflon a nízkohustotní polyetylen. Nebýt těchto materiálů, rozvoj podstatných elektronických součástí by byl značně komplikován. A tak první ^1H NMR signál atomů vodíku ^1H v parafinu byl naměřen v roce 1949 ve Stanfordu Felixem Blochem (*1905-†1983). Ten později v roce 1952 spolu s Edvardem Millsem Purcellem (*1912-†1997) získal Nobelovu cenu. Ovšem zařízení, které obsluhuje (Obrázek 4), ještě není klasický NMR spektrometr, ale spíše přístroj na měření magnetického momentu. Za více než 50 let se ale NMR spektrometrie dramaticky proměnila. Permanentní magnety a elektromagnety byly nahrazeny supravodivými, kde teplota kapalného helia dosahuje méně než 2 K. Velikost supravodivých magnetů, které dosahují závratných intenzit magnetických polí (více než 21 T, Obrázek 5), je přitom úctyhodná, zatímco elektronika se nyní vejde do několika malých krabiček. Původně byl poměr zcela opačný. Vzpomeňme na sálové počítače.



Obrázek 4. Supravodivý magnet o intenzitě magnetického pole větší než 21T.

Matematika – královna věd

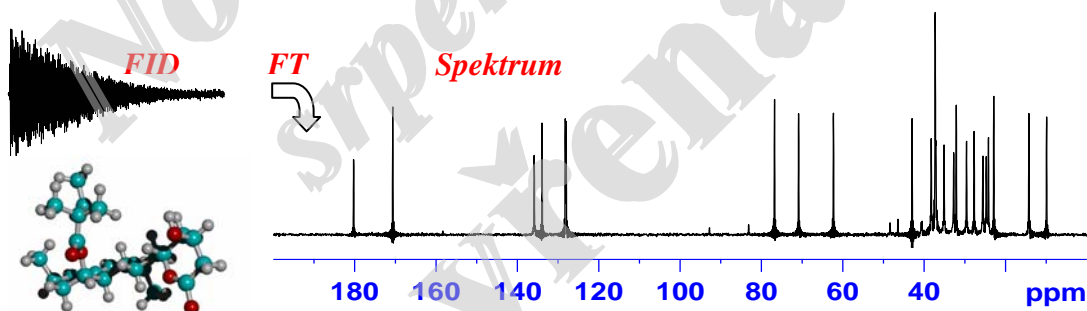
Vraťme se ale ještě na chvíli do historie. V historickém přehledu nesmíme zapomenout na jednoho muže, který se zcela nezastupitelně zapsal do knihy NMR spektrometrie a to už v době, kdy žádná NMR spektrometrie neexistovala. Je to důstojník

armády císaře Napoleona Bonaparta a jeden z největších matematiků světa Jean Babtiste Joseph Fourier (*1763-†1830). Původně se měl stát knězem, ale bližší mu byla matematika a armáda a tak se již v 16 letech stal učitelem matematiky na vojenské škole v Auxerre. Byl to také člověk s jistým politickým nadáním a ačkoli byl ve spojení s Revolučním výborem, zbytečný teror francouzské revoluce mu prý byl cizí. Možná i proto byl v roce 1794 uvězněn a čekal na popravu. Ale dříve než on na popravišti skončil samotný Robespierre. Díky tomu byl osvobozen a svět je o něco bohatší. J.B.J. Fourier ani poté na politiku nerezignoval a v roce 1798 vyrazil s Napoleonovou armádou na Východní expedici. Tehdy se stal guvernérem dolního Egypta a po návratu do Francie se stal prefektem Grenoblu. Jeho přínos pro NMR spektroskopii však nespočívá v jeho politické a diplomatické obratnosti, ale ve vypracování vztahů, které převádějí transformují funkce z časové oblasti do oblasti frekvenční. A právě touto procedurou získáváme tradiční frekvenční spektrum. Jeho transformace (Fourierova transformace - FT) vychází z předpokladu, že každý signál lze vyjádřit jako superpozici nekonečně mnoha sinusových signálů.



Obrázek 6. Jean Baptiste Joseph Fourier

O více než 150 let později tuto Fourierovu transformaci využil Richard R. Ernst (*1933, Nobelova cena 1991) k převedení výše zmiňované v čase volně dozívající indukce do klasické podoby frekvenčního NMR spektra, ve kterém nacházíme signály, jež lze přiřadit jednotlivým atomům a strukturním jednotkám v molekule. Takovéto spektrum je vlastně



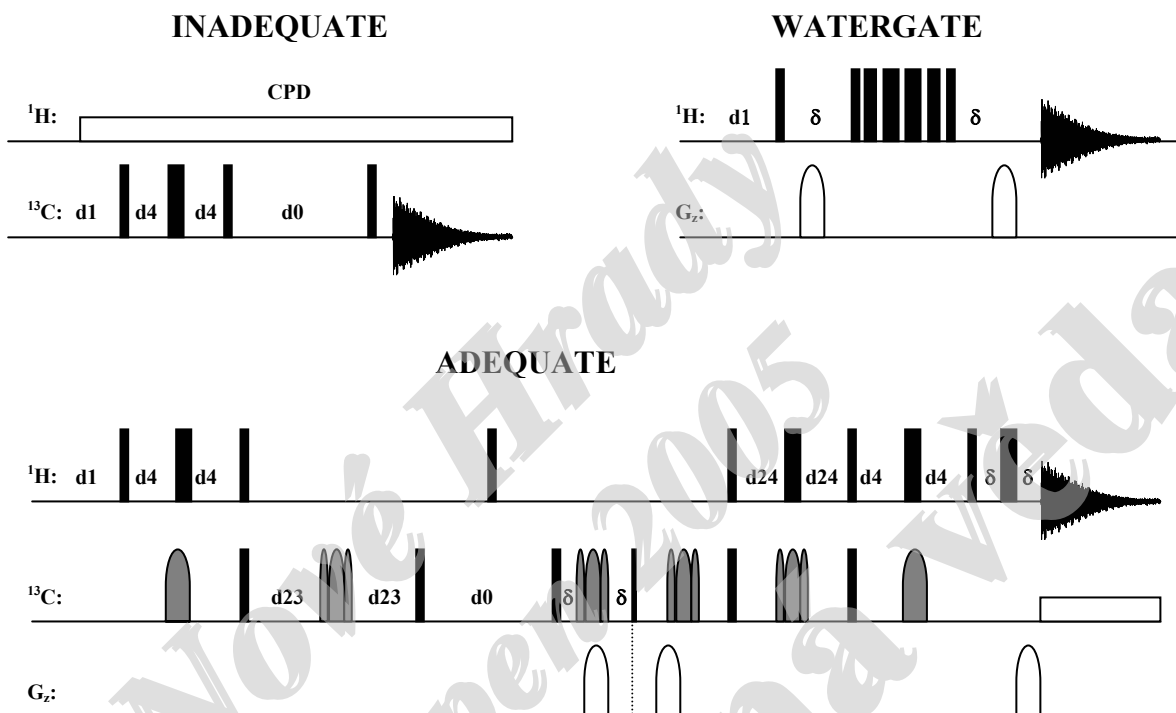
Obrázek 7. FID a Fourierovou transformací generované ^{13}C NMR spektrum simvastatinu a jeho molekulární struktura.

úplným zobrazením molekuly a její struktury (Obrázek 7). A naší snahou je pochopit tato spektra a na jejich základě rekonstruovat strukturu neznámé sloučeniny.

Spinová gymnastika a pulsní sekvence

Od poloviny 60. let minulého století se NMR spektrometrie již stala nedílnou a standardní součástí moderní chemie. A od roku 1971, kdy byl navržen první dvou-rozměrný experiment, pak NMR spektrometrie prošla dalším bouřlivým rozvojem. V tomto roce totiž Jean Jeener (*1931) na letní škole v Basko Polje v Jugoslávii navrhl zásadní korelační experiment (COSY - *CO*relatation *S*pectroscop Y). Tato jeho práce nikdy nebyla publikována v renomovaném časopise a přesto významně ovlivnila budoucí směřování NMR

spektrometrie. Zajímavé také je, že trvalo celých pět let než se podařilo tento experiment realizovat R.R. Ernstovi. Badatelé věnující se NMR se posléze pomocí pulsních sekvencí (Obrázek 8) naučili tak šikovně a vhodně manipulovat se spinovým systémem molekul, že mohou získat velmi přesné informace o meziatomových vzdálenostech, lokální geometrii



Obrázek 8. Schematické znázornění některých pulsních sekvencí: INADEQUATE, WATERGATE a ADEQUATE. Svislé úsečky označují pulsy elektromagnetického pole, oblé útvary pulsy lineární změny magnetického pole nebo měkké pulsy elektromagnetického pole.

molekuly, vzájemných interakcích a vnitřní pohyblivosti téměř všech sloučenin ve všech stavech. Díky této manipulaci, která se někdy nazývá „spinová gymnastika“, tak pokročilé NMR techniky více než deset let umožňují určit úplnou tří-rozměrnou strukturu proteinů v roztoku (Obrázek 9.). Jedním z nejvýznamnějších badatelů, kteří se zasloužili o rozpracování těchto technik je Kurt Wüthrich (*1938, Nobelova cena 2002). Díky tomu NMR spektrometrie překročila hranice fyziky a chemie a začala významně ovlivňovat biochemii a strukturní biologii.

V současné době již existuje několik tisíc NMR experimentů – pulsních sekvencí, které poskytují specifické informace o studovaném objektu. Většinu těchto sekvencí přiřadili jejich objevitelé názvy, které jsou někdy poněkud bizarní a zasluhují proto krátkou

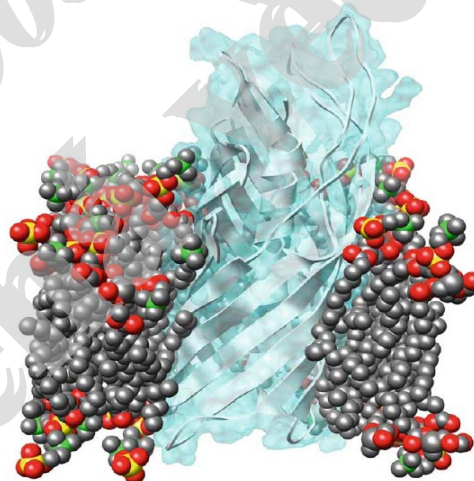


Obrázek 9. SH3 doména α -spektinu.

zmínku. Jistě některý NMR experiment se nám může jevit jako zcela nepostačující i když takový ve skutečnosti není (**INADEQUATE** - *Incredible Natural Abundance Double-QUAntum Transfer Experiment*), jiná technika zase může být moudrá (**WISE** - *Wide-line SEparation*), někdy se vše jeví jako pouhopouhý sen (**DREAM** - *Dipolar Recoupling Enhancement through Amplitude Modulation*), který podle mé zkušenosti velmi rychle může přejít v drama (**DRAMA** - *Dipolar Recovery At Magic Angle*) a nakonec dokonce v horor (**HORROR** - *HOmonucleaR ROTary Resonance*). Smysl pro humor je NMR spektroskopikům skutečně blízký a tak jedna z velmi často používaných technik pro potlačení signálu vody nese příznačný název **WATERGATE**. Právě tato technika, při jejímž objevu stál významný český badatel Vladimír Sklenář (*1951), případně její odvozeniny jsou dnes součástí prakticky všech experimentů, které slouží k popisu biologicky zajímavých systémů.

Strukturní biologie

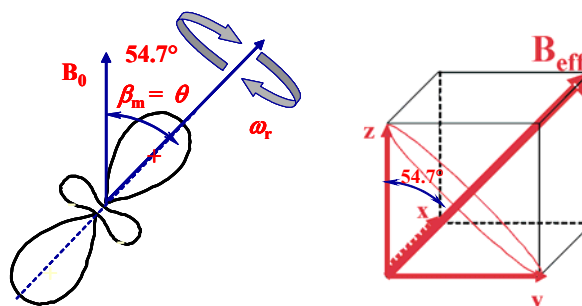
Zájem NMR spektroskopiků se velmi často soustřeďuje na biologicky zajímavé makromolekuly. Jde především o nukleové kyseliny, peptidy a proteiny, které řídí řadu biologických procesů v živých buňkách. Ať už jde o stabilizaci membránových potenciálů, přenos signálu, či regulace objemu buňky, všechny tyto procesy a především poruchy těchto procesů mohou vést k vážným poškozením celého organismu. Pro pochopení těchto procesů a nalezení zákonitostí mezi nimi, je znalost úplné struktury těchto látek klíčová. Celá řada struktur rozpustných proteinů již byla úspěšně stanovena a to jak rentgenovou difrací složitě připravených krystalů, tak užitím NMR v roztoku. Avšak 30 % všech proteinů se nalézá v přirozeném stavu v lipidových membránách (Obrázek 10) a tak je pochopitelné, že převést takovýto systém do roztoku, či připravit vhodný krystal a zároveň zachovat podstatné funkční vlastnosti, je velice obtížné. A právě pro řešení těchto problémů se nabízí NMR spektrometrie v tuhé fázi.



Obrázek 10. Uspořádání membránového proteinu v lipidové membráně

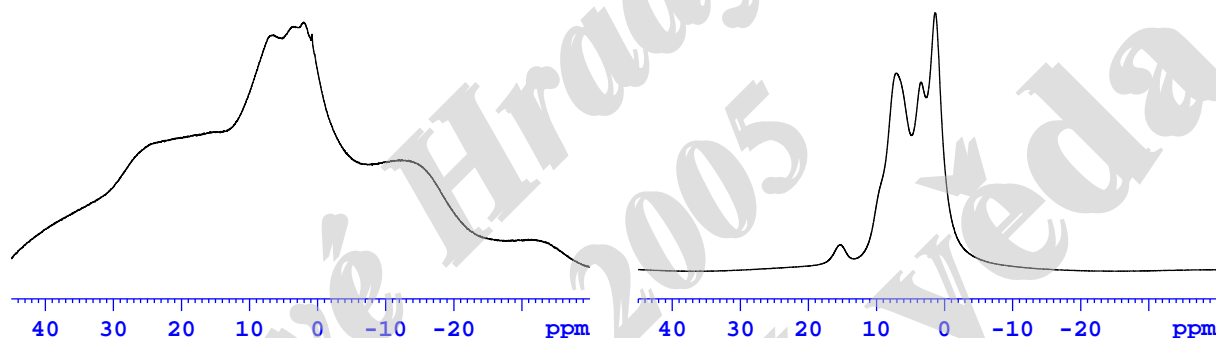
NMR spektrometrie tuhého stavu

Tato technika má na rozdíl od NMR v roztoku řadu specifíků. Například vzorek musí velice rychle rotovat, přičemž frekvence rotace dosahuje běžně až 35 kHz. Dále musí osa rotace svírat se směrem vnějšího magnetického pole úhel $54,7^\circ$. Tomuto úhlu se říká „magický“, protože právě při rotaci pod tímto úhlem



Obrázek 11. Schematická reprezentace anizotropní části tenzoru chemického posunu a magická rotace v jednotkové krychli.

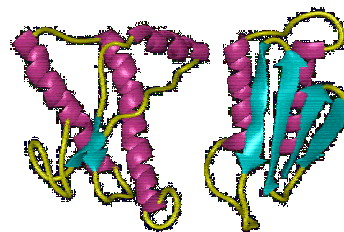
se spinový systém tuhé látky začíná chovat jako by byl v roztoku. To lze zjednodušeně chápat tak, že vysoká rychlost rotace vnutí molekulárnímu systému a tak každému elektronovému oblaku kubickou symetrii. Úhel 54.7° totiž svírá tělesová úhlopříčka se stranami v krychli (Obrázek 11). Techniku rotace vzorku pod magickým úhlem poprvé navrhli E.R. Andrew (*1921) a I.J. Lowe (*1929) v letech 1958 a 1959. Ovšem tehdejší práce byly prováděny na anorganických materiálech pro odstranění anizotropie chemického posunu. A v tento okamžik do příběhu vstupuje Bohdan Schneider (*1927) z Ústavu makromolekulární chemie ČSAV. V roce 1962 byl na tomto ústavu instalován NMR spektrometr JEOL-JNM-3-60, který měl napomoci řešit strukturní problémy ne anorganických látek, ale často nerozpustných polymerů. Teoreticky vzdělaní fyzici však tehdy dokazovali, že v ^1H NMR spektrech se žádný pozitivní efekt rotace vzorku pod magickým úhlem nemůže projevit, poněvadž šířka



Obrázek 12. ^1H MAS NMR spektra změřená při rotaci 8 kHz (vlevo) a 32 kHz (vpravo).

signálů protonů v rigidních systémech je příliš veliká. Anebo naopak u systémů, jejichž signál byl již užší, se předpokládalo, že vnitřní pohyb je tak veliký, že se makroskopická rotace opět neprojeví. Navzdory těmto teoretickým předpokladům se B. Schneider nedal odradit a do roku 1967 zkonstruoval plexisklovou kyvetu, do které byly vyfrézovány lopatky. Samozřejmě, že bylo sledováno zužování signálů a dnes se ultravysoké rotace vzorku pod magickým úhlem (50-70 kHz) používají pro získání vysoce rozlišených ^1H MAS NMR spekter (Obrázek 12). Tehdy také B. Schneider vyslovil domněnku, že *jediným úkolem teoretiků je vždy vyložit, proč experiment vyšel tak, jak vyšel, a že dobrý teoretik si najde vždy vysvětlení toho, že to co vyšlo, je zrovna správně.*

Od roku 1976 kdy byla poprvé uvedena a použita nyní již standardní uhlíková ^{13}C CP/MAS NMR spektrometrie tuhých látek, její význam neustále roste. Zvláště pro charakterizaci látek, jež lze jinými technikami popsat jen velmi obtížně. Především jde o již zmiňované membránové proteiny anebo zcela nerozpustné peptidy a proteiny, které způsobují velice vážná mozková poškození. Tím jsou především β -amyloidová vlákna prionových proteinů způsobující Alzheimerovu nebo Creutzfeldovu - Jakobovu chorobu. Nerozpustné priony jsou vlastně defektní proteiny, které buď pod vlivem genetických dispozic nebo z neznámých důvodů nejprve změni svou vlastní

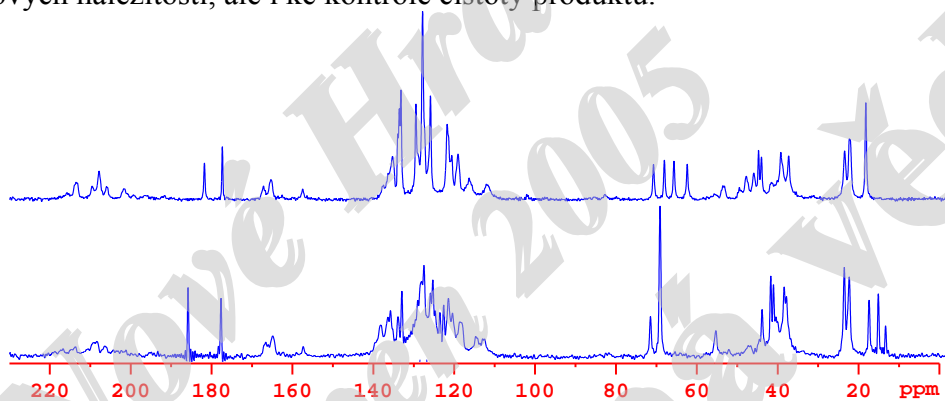


Obrázek 13. Porovnání struktury zdravého prionu (PrPC) a poškozeného prionu (PrPSc).

strukturu a konformaci a následně pak sousední proteiny z normální rozpustné formy na nebezpečnou nerozpustnou formu (Obrázek 13). Najít zákonitosti mezi strukturálními změnami a „infekčním“ chováním prionů je jednou z výzev právě pro moderní NMR spektroskopii tuhého stavu. Faktem také je, že první výsledky na sebe nenechaly dlouho čekat a 9. června tohoto roku vyšla v prestižním časopise *Nature* (435, 844, 2005) práce, jež poodhaluje některá tajemství.

NMR krystalografie

NMR spektrometrie tuhého stavu však nezkoumá pouze biologické materiály, jak by se mohlo z výše uvedeného zdát. Významným způsobem zasahuje i do průmyslových oblastí např. do oblasti farmaceutického průmyslu. Zde slouží především pro popis fázového složení polykrystalických aktivních substancí řady léků. To je podstatné nejenom k zajištění všech patentových náležitostí, ale i ke kontrole čistoty produktu.



Obrázek 14. ^{13}C CP/MAS NMR spektra dvou krystalových forem atorvastatinu.

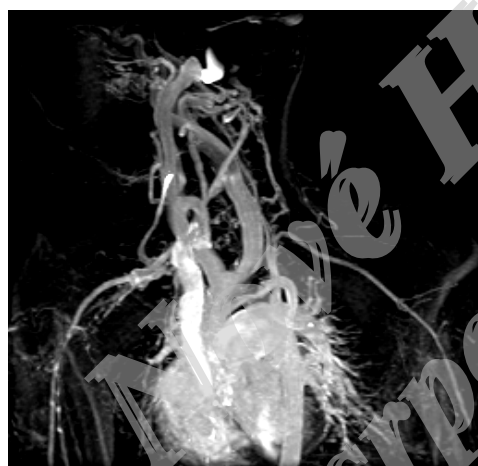
Historicky to sice je prášková rentgenová difrakce, která stále zaujímá neotřesitelně první pozici při identifikaci různých krystalových forem lékových substancí, ale díky dosažitelnému spektrálnímu rozlišení rozsah využívání NMR tuhé fáze velmi rychle vzrůstá. Aplikovatelnost této metody ve farmaceutickém průmyslu je však podmíněna možností poskytovat požadované informace v relativně krátkém čase a možností analyzovat látky v přirozeném izotopickém zastoupení. Z toho plyne, že základním nositelem strukturálních informací je především chemický posun (Obrázek 14). To je rozdíl frekvence precesního pohybu zkoumaného atomu v molekule od reference standardu. Chemický posun totiž velice citlivě reaguje i na nepatrné změny v rozložení hustoty elektronů v okolí detekovaných jader. V tom nejjednodušším přiblížení NMR chemický posun slouží k rozlišení a identifikaci jednotlivých polymorfů, solvatomorfů, či hydrátů. Zajímavou možností je také schopnost identifikace nestechiometrických hydrátů a lokalizace molekul vody v krystalových kanálech. V neposlední řadě pak analýza NMR spekter krystalických látek může vést k určení základních parametrů krystalografické jednotky. Tyto informace spolu s pochopením povahy vodíkových vazeb poutající molekuly do třírozměrné struktury a lokalizace odpovídajícího vodíkového atomu umožňují rekonstrukci úplné 3D struktury. Na rozdíl od difrakčních technik totiž dokáže NMR spektrometrie velmi přesně lokalizovat pozici vodíkových atomů s přesností $\pm 2\text{-}5$ pm.

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Ale ponechme NMR krystalografii jejímu osudu. Od farmacie je jen krok k medicíně, kde se nukleární magnetická rezonance stala významnou diagnostickou metodou. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI – Magnetic Resonance Imaging) je založeno na stejných principech jako NMR. Správnější by bylo nazývat tuto diagnostickou metodu jako „zobrazování nukleární magnetickou rezonancí“, ale slovo „nukleární“ budilo v 70. letech minulého století, v dobách studené války, nepříjemné asociace a proto se jednoduše vypustilo. Přesto již téměř 30 let tato metoda zobrazuje různé části organismu a poskytuje obrázky orgánů s velmi vysokým rozlišením a kontrastem (Obrázek 15).



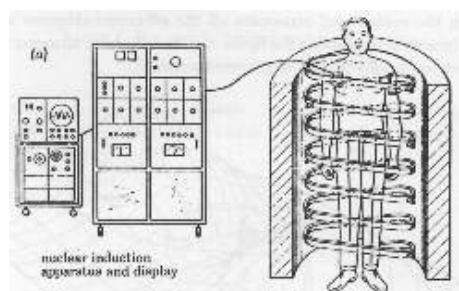
Obrázek 15. Axiální řez hlavy v hloubce 22 cm.



Obrázek 16. Cévní řečiště hrudníku a krku.

Všichni víme, že se lidský organismus skládá převážně z vody, ale až v roce 1971 si Raymond Damadian (*1936) uvědomil a pak také i ukázal, že chování molekul vody ve zdravé a nemocné tkáni může být různé. Rozdíl je především v pohyblivosti molekul vody, která souvisí s teplotou případně obsahem různých solí a iontů. První obrázek pořídil v roce 1973 Paul Lauterbur (*1929). V roce 1975 Richard R. Ernst navrhl techniky fázového a frekvenčního kodování a v roce 1977 Peter Mansfield (*1933) vyvinul echo-planární zobrazování (EPI). V té době pořízení jednoho obrázku trvalo několik minut, ale od roku 1986 se potřebný čas snížil na několik sekund. V témž roce byl vyvinut NMR mikroskop, který umožnil dosáhnout mikrometrového rozlišení na vzorcích velkých cca 1 cm. V roce 1987 echo-planární zobrazování umožnilo kontinuální sledování srdeční

funkce a ve stejném roce Charles Dumoulin rozvinul angiografii (MRA – Magnetic Resonance Angiography), která dokáže při použití speciálních kontrastních látek na bázi komplexů gadolinia perfektně zobrazovat krevní řečiště (Obrázek 16). V tomto bodě se moderní NMR spektrometrie a tedy i MRI opět setkává s Ústavem makromolekulární chemie, kde byl vyvinut speciální kontrastní polymerní systém na bázi vodorozpusných komplexů kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu s gadoliniem. Dlouhodobá stabilita, biokompatibilita a především vysoká relaxivita těchto látek jsou optimální vlastnosti pro získání detailních a ostrých obrázků i velice subtilních struktur a útvarů.



Obr. 17. Schéma přístroje na zobrazování magnetickou rezonancí (autor R. Damadian).



Obrázek 18. MRI tomograf Magnetom Trio 3T od firmy Siemens (nahore) a „stand-up“ MRI tomograf FONAR (dole).

Abych učinil povinnosti zadost, musím uvést že v roce 2003 Sir Paul C. Lauterbur z Univerzity v Illinois a Sir Peter Mansfield z Univerzity v Nottinghamu byli společně oceněni Nobelovou cenou v oblasti medicíny za jejich objevy a přínos v oblasti zobrazování magnetickou rezonancí. Otázkou zůstává proč nebyl spolu s nimi oceněn skutečný objevitel této metody a autor patentu na NMR tomograf R. Damadian (Obrázek 17).

MRI je nepochybně mladou a dynamicky rostoucí vědní disciplínou. Například v 2003 bylo na světě přibližně 10000 diagnostických zařízení (Obrázek 18), které pořídily odhadem 75 milionů obrázků.

Funkční MRI

Modifikace, která rozhodně stojí za zmínku, je tzv. funkční MRI (fMRI). Při ní se využívá faktu, že působením kyslíku se protony velice rychle vracejí do výchozího magnetického stavu (relaxují), takže lze MRI záznamy snímat v milisekundových intervalech. Jelikož zejména neurony, které jsou ve zvýšené činnosti, spotřebují daleko více kyslíku, je možno řadou rychle za sebou následujících tomografických snímků zobrazit např. šíření nervových vzruchů po nějakém smyslovém nebo i slovním podnětu v různých oblastech lidského mozku. Na tomto principu byla sledována funkce mozku během mrkání oka. Ukázalo se, že při každém mrknutí oka, které trvá asi 150 ms, se u člověka deaktivují některé části mozku, především je to zraková kůra, která je obvykle v plné pohotovosti ve chvílích, kdy člověk vnímá objekty okolního světa. Pravděpodobně díky těmto výpadkům si lidé neuvědomují, že mrkají. Je tedy zřejmé, že perspektivy tohoto oboru jsou doslova nedohledné.

Krátký závěr

Ačkoli se to nezdá, NMR spektrometrie a techniky s ní související se od roku 1950 úspěšně rozšířily a zasáhly řadu oblastí nejenom vědy, ale také průmyslu a samozřejmě medicíny. Lze tvrdit, že NMR spektrometrie je stále velice rychle se rozvíjející oblast strukturní analýzy a lze předpokládat, že s budoucím metodickým a technickým pokrokem se naše znalosti struktury hmoty ještě více prohloubí. Zvláště pak nalezení vztahu a zákonitostí mezi strukturou, vnitřní pohyblivostí a funkčním chováním zkoumaného systému nám umožní pochopit řadu jevů a díky tomu i vhodně a cíleně připravovat nové materiály, případně lépe řešit a předcházet řadě zdravotních problémů.